

(2)

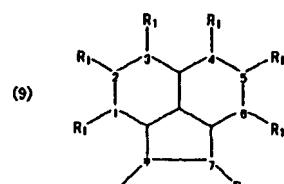
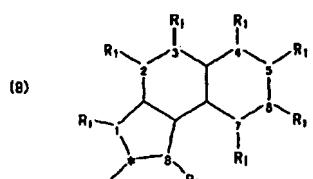
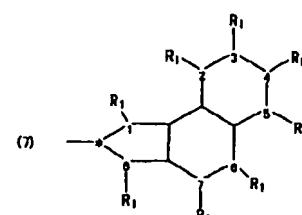
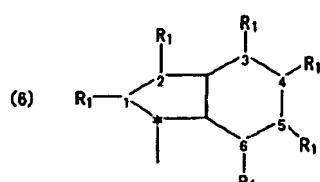
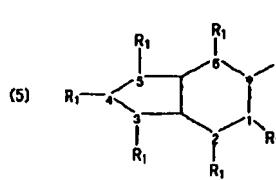
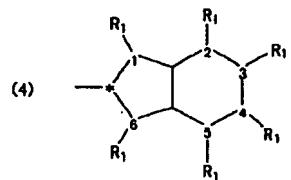
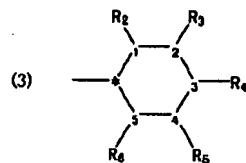
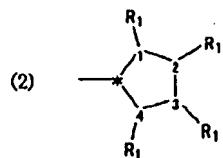
## 【特許請求の範囲】

1. 有効量の式(1)を有する化合物又は薬剤として許容可能な前記化合物の塩と有効量のペータラクタム抗生物質とを感染に罹患した動物に投与する工程から成る、ペータラクタム抗生物質耐性細菌感染を治療するための方法。



(ここで、

Rはナフタレン若しくはフェナントレンであるか、又は以下の式のうちの1つを有し、



(19)日本特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-135093

(P2003-135093A)

(43)公開日 平成15年5月13日(2003.5.13)

(51)Int.Cl.\*

C 12 Q 1/06

C 12 M 1/34

識別記号

F I

C 12 Q 1/06

C 12 M 1/34

マーク\* (参考)

4 B 0 2 9

A 4 B 0 6 3

審査請求 未請求 請求項の数15 O.L (全 12 頁)

(21)出願番号

特願2001-331756(P2001-331756)

(22)出願日

平成13年10月30日(2001.10.30)

(71)出願人 000120456

榮研化学株式会社

東京都文京区本郷1丁目33番8号

(72)発明者 中島 一弘

栃木県下都賀郡野木町野木143 榮研化学  
株式会社生物化学研究所

(72)発明者 新居 美幸

栃木県下都賀郡野木町野木143 榮研化学  
株式会社生物化学研究所

(72)発明者 馬目 功

栃木県下都賀郡野木町野木143 榮研化学  
株式会社生物化学研究所

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 メタロー-β-ラクタマーゼ産生菌の薬剤感受性試験方法

(57)【要約】

【課題】本発明は院内感染の原因菌として問題になっているメタロー-β-ラクタマーゼ産生菌の薬剤感受性試験方法を提供する。

【解決手段】β-ラクタム薬を含有する液体培地と、β-ラクタム薬/メタロー-β-ラクタマーゼ阻害剤としてジカルボン酸誘導体を含有する液体培地との組合せを用いることを特徴とするメタロー-β-ラクタマーゼ産生菌の薬剤感受性試験方法。

(2) 003-135093 (P2003-135093A)

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 $\beta$ -ラクタム薬を含有する液体培地と、 $\beta$ -ラクタム薬およびメタロー- $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤としてジカルボン酸誘導体を含有する液体培地との組合せを用いることを特徴とするメタロー- $\beta$ -ラクタマーゼ产生菌の薬剤感受性試験方法。

【請求項2】ジカルボン酸誘導体がピリジン置換誘導体である請求項1記載のメタロー- $\beta$ -ラクタマーゼ产生菌の薬剤感受性試験方法。

【請求項3】ピリジン置換誘導体が2, 3-ピリジンジカルボン酸、2, 4-ピリジンジカルボン酸、2, 5-ピリジンジカルボン酸、2, 6-ピリジンジカルボン酸、3, 4-ピリジンジカルボン酸、および3, 5-ピリジンジカルボン酸から成る群から選択される少なくとも1種である請求項2記載のメタロー- $\beta$ -ラクタマーゼ产生菌の薬剤感受性試験方法。

【請求項4】 $\beta$ -ラクタム薬がセフタジム、セフォタキシム、セフトリアキソン、セフボドキシム、セフピロム、セフェビム、セフメタゾール、セフミノクス、イミペネム、パニペネム、およびメロペネムから成る群から選択される少なくとも1種である請求項1記載のメタロー- $\beta$ -ラクタマーゼ产生菌の薬剤感受性試験方法。

【請求項5】 $\beta$ -ラクタム薬0.25-128 $\mu$ g/mlを含有する液体培地と、 $\beta$ -ラクタム薬0.25-128 $\mu$ g/mlおよびメタロー- $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤としてジカルボン酸誘導体100-1600 $\mu$ g/mlを含有する液体培地との組合せを用いる請求項1乃至4記載のメタロー- $\beta$ -ラクタマーゼ产生菌の薬剤感受性試験方法。

【請求項6】液体培地がミューラー・ヒントン液体培地、陽イオン調整ミューラー・ヒントン液体培地、ブレインハートインフュージョン液体培地、トリアトソイ液体培地、ABC M液体培地、溶血液加ミューラー・ヒントン液体培地、シェドラー液体培地、ブルセラ液体培地、および溶血液添加ブルセラ液体培地から成る群から選択される請求項1記載のメタロー- $\beta$ -ラクタマーゼ产生菌の薬剤感受性試験方法。

【請求項7】請求項1乃至6記載の薬剤感受性試験に用いる多穴容器であって、該多穴容器の各穴に $\beta$ -ラクタム薬を含有する液体培地と、 $\beta$ -ラクタム薬およびメタロー- $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤としてジカルボン酸誘導体を含有する液体培地とを分注したことを特徴とするメタロー- $\beta$ -ラクタマーゼ产生菌の薬剤感受性試験に用いる多穴容器。

【請求項8】使用時まで凍結保存されている請求項7記載の多穴容器。

【請求項9】請求項1乃至6記載の薬剤感受性試験に用いる多穴容器であって、該多穴容器の各穴に $\beta$ -ラクタム薬と、 $\beta$ -ラクタム薬およびメタロー- $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤としてジカルボン酸誘導体とを分注し、各穴の薬剤を乾燥固定化したことを特徴とするメタロー- $\beta$ -ラ

クタマーゼ产生菌の薬剤感受性試験に用いる多穴容器。

【請求項10】請求項1乃至6記載の薬剤感受性試験に用いる多穴容器であって、該多穴容器の各穴に $\beta$ -ラクタム薬を含有する液体培地と、 $\beta$ -ラクタム薬およびメタロー- $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤としてジカルボン酸誘導体を含有する液体培地とを分注し、各穴の薬剤を含有する液体培地を乾燥固定化したことを特徴とするメタロー- $\beta$ -ラクタマーゼ产生菌の薬剤感受性試験に用いる多穴容器。

【請求項11】メタロー- $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤としてジカルボン酸誘導体を含有することを特徴とするディスク。

【請求項12】ジカルボン酸誘導体がピリジン置換誘導体である請求項11記載のディスク。

【請求項13】ピリジン置換誘導体が2, 3-ピリジンジカルボン酸、2, 4-ピリジンジカルボン酸、2, 5-ピリジンジカルボン酸、2, 6-ピリジンジカルボン酸、3, 4-ピリジンジカルボン酸、および3, 5-ピリジンジカルボン酸から成る群から選択される少なくとも1種である請求項12記載のディスク。

【請求項14】 $\beta$ -ラクタム薬を含有するディスクと $\beta$ -ラクタム薬およびメタロー- $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤としてジカルボン酸誘導体を含有するディスクとの組合せを用いることを特徴とするメタロー- $\beta$ -ラクタマーゼ产生菌の薬剤感受性試験方法。

【請求項15】 $\beta$ -ラクタム薬を含有するディスクとメタロー- $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤としてジカルボン酸誘導体を含有する寒天平板培地とを用いることを特徴とするメタロー- $\beta$ -ラクタマーゼ产生菌の薬剤感受性試験方法。

**【発明の詳細な説明】**

**【0001】**

【発明の属する技術分野】本発明は、 $\beta$ -ラクタム薬を含有する液体培地と $\beta$ -ラクタム薬およびメタロー- $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤としてジカルボン酸誘導体を含有する液体培地との組合せを用いたメタロー- $\beta$ -ラクタマーゼ产生菌の薬剤感受性試験方法に関する。

【0002】本発明では次の略語を使用することがある。

**【略語表】**

MBL : メタロー- $\beta$ -ラクタマーゼ (Metallo-Beta-Lactamase)

ESBL : 基質拡張型 $\beta$ -ラクタマーゼ (Extended Spectrum Beta-Lactamase)

SMA : メルカブト酢酸ナトリウム (Mercaptoacetic Acid Sodium salt)

MPA : 2-メルカブトプロピオン酸 (2-Mercaptopropionic Acid)

SMP : 2-メルカブトプロピオン酸ナトリウム (2-Mercaptopropionic Acid Sodium salt)

(3) 003-135093 (P2003-135093A)

DPA : ジピコリン酸 (2,6-pyridinedicarboxylic acid)

CAZ : セフタジム

IPM : イミペネム

NCCCLS : 米国臨床検査標準委員会 (National Committee for Clinical Laboratory Standards)

MIC : 最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration)

MHA : ミューラー・ヒントン寒天培地 (Mueller Hinton Agar)

MHB : ミューラー・ヒントン液体培地 (Mueller Hinton Broth)

CAMHA : 陽イオン調整ミューラー・ヒントン寒天培地 (Cation Adjusted Mueller Hinton Agar)

CAMHB : 陽イオン調整ミューラー・ヒントン液体培地 (Cation Adjusted Mueller Hinton Broth)

#### 【0003】

【従来の技術】 $\beta$ -ラクタム薬 ( $\beta$ -ラクタム系抗菌薬) は、その分子構造母核中に $\beta$ -ラクタム環を持つ抗菌薬の総称でペニシリンの発見以来、多くの $\beta$ -ラクタム薬が開発されている。この $\beta$ -ラクタム薬の開発に伴い、その分子構造中の $\beta$ -ラクタム環を加水分解して、その抗菌作用を無効化する酵素 $\beta$ -ラクタマーゼを産生する耐性菌 ( $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌) が出現した。 $\beta$ -ラクタマーゼはクラスA～D型に分類される。このうちクラスB型酵素はその活性中心に亜鉛などの金属イオンを有しているので、メタロー- $\beta$ -ラクタマーゼ (MBL) と呼ばれている。MBLの阻害剤としてはチオール化合物やEDTAなどが知られている(特開2000-224998号公報)。

【0004】MBL産生菌は、MBLを産生することにより、ペニシリン系からセフェム系、セファマイシン系、カルバペネム系抗菌薬に至るまでの幅広い範囲の $\beta$ -ラクタム薬に耐性を獲得した。近年になって、これらの $\beta$ -ラクタム薬に耐性を示す綠膿菌やセラチア菌などのグラム陰性桿菌 (MBL産生菌) が各地の医療施設から分離され問題となっている。MBLをプラスミド性に産生する菌は、これまでわが国でのみ分離されてきたが、最近、外国においても分離され、海外の専門家の間でも関心が高まりつつある (Lancet., 352, 546; 1998)。

【0005】MBL産生菌は、セファロスボリナーゼ過剰産生株などと類似の薬剤耐性パターンを示すが、後者がカルバペネム薬に感受性を示すのに対し、MBL産生菌は、当初カルバペネム薬に感受性を示している株も、カルバペネム薬の存在下で酵素の産生が誘導され、やがてカルバペネム薬に耐性を示すようになる。従って、有効かつ適正な化学療法を実施する上で、両者を早期に識別できる検査方法の確立が必要となっていた。

【0006】MBL産生菌は、第3世代セフェム系やセファマイシン系に高度耐性を示し、カルバペネム系にも

低度～高度耐性を示す。しかし、同様に第3世代セフェム系に高度耐性を示すセファロスボリナーゼ過剰産生株などとMBL産生菌とを病院の検査室において日常的に実施されている薬剤感受性試験や酵素学的な検査方法により識別することはこれまで不可能であった。このため、PCR法によるMBL遺伝子を検出する方法以外に確実にMBLを判別する方法はなかった(臨床と微生物., 26(2), 153, 1999)。

【0007】この現状に鑑み、国立感染症研究所の荒川らはMBL産生菌を容易に判別することが可能なディスク拡散法を開発し、既にJ. Clin. Microbiol. に文献発表を行い(J.Clin.Microbiol., 38(1), 40, 2000)、また特許出願も行っている(特願平11-26897号)。この方法は合計3枚の汎紙ディスクを用いる方法である。まず、直径6.35mmの汎紙ディスクに、MBL阻害剤としてメルカブト酢酸(MAA)、メルカブトプロピオン酸(MPA)、メルカブトエタノール等のチオール化合物を含浸させたMBL阻害剤ディスクを作成する。次いで、CAZなどの $\beta$ -ラクタム薬を含有する乾燥ディスク2枚を、被検菌を塗布した寒天平板上に距離を置いて静置し、一方のCAZディスクに近接してMBL阻害剤ディスクを静置し、阻害剤の影響下で形成される阻止円の形状と、阻害剤の影響のない通常の阻止円の形状の違いを観察し、MBL産生菌であるかどうかを判定するものである。この方法では、得られる阻止円の形状・大きさがMBL阻害剤ディスクの有無で全く異なるため、MBL産生菌であるかどうか容易に判定することができる。

【0008】しかしながら、上記判定方法では、MBL産生菌であるかどうかは定性的に判定できるが、定量的な最小発育阻止濃度(MIC)を求めることはできない。また、使用したチオール化合物(MBL阻害剤)は揮発性であるため、阻害剤ディスクは乾燥ができず、用時調製で用いるしかなく、操作性にやや問題が残った。

【0009】また、本発明者らはMAA、MPA、SMA等のチオール化合物(MBL阻害剤)とCAZ等の $\beta$ -ラクタム薬を用いた微量液体希釈法によるMIC測定も試みた。この方法は、96穴マイクロプレートを用い、2倍の希釈系列でCAZO. 25-128μg/mlを含有する液体培地の希釈系列と、一定量のMBL阻害剤及びCAZO. 25-128μg/mlを含有する液体培地希釈系列との組合せを用い、被検菌を培養し、MICを測定する方法である。この方法でCAZ単独のMIC及びCAZ/MPA合剤のMICが容易に測定でき、またその差もMBL産生菌では明確であった。

【0010】しかしながら、使用したチオール化合物(MBL阻害剤)は、揮発性であり、悪臭を発する。そのため、特に試薬の調製時にその悪臭が検査室全体に広がり、このままルーチン検査として用いるには問題が多いものであった。このため、本発明者らは、MBL阻害

(4) 003-135093 (P2003-135093A)

剤としてチオール化有機酸を用い、この有機酸を適當なアルカリ塩とすることにより、その不揮発化を図り、不揮発化したMBL阻害剤が揮発性のチオール化有機酸と同様なMBL阻害作用があることを見出し、この阻害剤を用いたメタロー-β-ラクタマーゼ産生菌の薬剤感受性試験方法を既に提案している（特願2000-121982号）。

#### 【0011】

【発明が解決すべき課題】しかしながら、本発明者のその後の研究によれば、使用したMBL阻害剤とβ-ラクタム薬とを混合して乾燥を行うと、β-ラクタム薬の保存安定性が悪く、短期間に力価の低下が認められた。特にカルバペネム系抗菌薬では、乾燥直後に力価の低下が顕著であった。そのため、96穴マイクロプレートを乾燥してルーチン検査として用いるには未だ問題があった。

【0012】従って本発明は、β-ラクタム薬の保存安定性が良く、長期間に亘ってβ-ラクタム薬の力価を安定時に維持できるので、ルーチン検査に有用でMIC測定が可能なMBL産生菌の感受性試験方法及びそれに使用する多穴容器を提供でき、さらにβラクタム薬およびMBL阻害剤の2薬を合剤として含有する乾燥した沪紙ディスクを提供すること、さらに進めて、βラクタム薬およびMBL阻害剤の2薬を合剤として含有する乾燥したMIC測定用の多穴容器を提供することを目的とする。

#### 【0013】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究した結果、メルカブト基を有さない、キレート作用の強いジカルボン酸誘導体をMBL阻害剤として用いることにより、β-ラクタム系抗菌薬の力価の低下をきたすことなく、チオール化有機酸と同様のMBL阻害作用があることを見だし、本発明を完成了。

【0014】本発明は、β-ラクタム薬を含有する液体培地と、β-ラクタム薬およびMBL阻害剤としてジカルボン酸誘導体を含有する液体培地との組合せを用いるMBL産生菌の薬剤感受性試験方法を提供する。

【0015】本発明に使用するMBL阻害剤であるジカルボン酸誘導体は、β-ラクタム系抗菌薬の力価に影響を及ぼすことなく、かつ細菌毒性の少ないジカルボン酸誘導体である限り、公知のものの中から適宜選択することができる。そのようなジカルボン酸誘導体の中でも、特にピリジン置換誘導体が好ましい。このピリジン置換誘導体としては、例えば、2,3-ピリジンジカルボン酸、2,4-ピリジンジカルボン酸、2,5-ピリジンジカルボン酸、2,6-ピリジンジカルボン酸、および3,5-ピリジンジカルボン酸から成る群から選択される少なくとも1種が挙げられるが、特に2,6-ピリジンジカルボン酸(DP

A:ジビコリン酸)が好ましい。

【0016】また、本発明で用いるβ-ラクタム薬は、その分子構造母核中にβ-ラクタム環を持つ抗菌薬の中から適宜選択すれば良い。その具体例としては、セフタジム、セフォタキシム、セフトリアキソン、セフボドキシム、セフィロム、セフェビムなどの第三・第四世代セフェム系抗菌薬、セフメタゾール、セフミノクスなどの第二・第三世代セファマイシン系抗菌薬、イミペネム、パニベネム、メロペネムなどのカルバペネム系抗菌薬から成る群から選択される少なくとも1種が挙げられる。これらのβ-ラクタム薬の中でも、セフタジム(CAZ)やイミペネム(IPM)が好ましく用いられる。

【0017】本発明のMBL産生菌の薬剤感受性試験方法をより具体的に説明すると、β-ラクタム薬0.25-128μg/mlを含有する液体培地と、β-ラクタム薬0.25-128μg/mlおよびMBL阻害剤としてジカルボン酸誘導体100-1600μg/mlを含有する液体培地との組合せを用いる。β-ラクタム薬の含有量が0.25μg/ml未満になると、その抗菌作用が低下し、逆に128μg/mlを超えると、抗菌薬が溶解し難くなる。また、MBL阻害剤であるジカルボン酸の含有量が100μg/ml未満になると、MBL阻害効果が得られず、逆に1600μg/mlを超えると、菌の発育を阻害する。

【0018】本発明に用いる液体培地としては、微量液体希釈法に用いられる一般的な液体培地であれば、特に制限されない。その具体例としては、ミューラー・ヒントン液体培地、陽イオン調整ミューラー・ヒントン液体培地、ブレインハートインフュージョン液体培地、トリプトソイ液体培地、ABC M液体培地、溶血液加ミューラー・ヒントン液体培地、シェドラー液体培地、ブルセラ液体培地、溶血液添加ブルセラ液体培地が挙げられる。これらの液体培地の中でも、特にミューラー・ヒントン液体培地(MHB)や陽イオン調整ミューラー・ヒントン液体培地(CAMHB)が好ましく用いられる。

【0019】また、本発明は、上記で説明したMBL産生菌の薬剤感受性試験に用いる多穴容器であって、多穴容器の各穴にβ-ラクタム薬を含有する液体培地と、β-ラクタム薬およびMBL阻害剤としてジカルボン酸誘導体を含有する液体培地とを分注したMBL産生菌の薬剤感受性試験に用いる多穴容器も提供する。多穴容器としては、この業界で通常使用されているものであれば、特に限定されないが、一般的には96穴マイクロプレートが好ましく用いられる。この多穴容器は、生培地などの液体培地を分注した容器として供給されても良いが、保存安定性を考慮すると、使用時まで凍結保存した形態で供給されることが好ましい。本発明においては、各穴の薬剤のみを乾燥固定化した多穴容器として供給されても良いし、薬剤を含有する液体培地を乾燥固定化した多

(5) 003-135093 (P2003-135093A)

穴容器として供給されても良い。乾燥固定化方法としては、薬剤や培地成分が変質しない限り、特に制限されず、自然乾燥、送風乾燥、凍結乾燥といった一般的な乾燥方法が挙げられる。

【0020】更に、本発明は、MBL阻害剤としてジカルボン酸誘導体を含有するディスクをも提供する。本発明のディスクは、円形である限りその直径は特に問わないが、一般的に使用されているKBディスクと同様の直径6.35mmの汎紙ディスクに一定量のジカルボン酸誘導体を添加・乾燥したものが好ましい。ジカルボン酸誘導体の含浸量は、汎紙ディスク一枚当たり0.1-3mgが適当である。

【0021】本発明に用いるジカルボン酸誘導体としては、上述したように、公知のものの中から適宜選択することができ、その中でも、特にピリジン置換誘導体が好ましい。このピリジン置換誘導体としては、例えば、2,3-ビリジンジカルボン酸、2,4-ビリジンジカルボン酸、2,5-ビリジンジカルボン酸、2,6-ビリジンジカルボン酸、3,4-ビリジンジカルボン酸、および3,5-ビリジンジカルボン酸から成る群から選択される少なくとも1種が挙げられるが、特に2,6-ビリジンジカルボン酸(DPA:ジピコリン酸)が好ましい。

【0022】本発明は、 $\beta$ -ラクタム薬を含有するディスクと $\beta$ -ラクタム薬およびMBL阻害剤を含有するディスクとの組合せを用いるMBL産生菌の薬剤感受性試験方法でもあり得る。本発明においては、 $\beta$ -ラクタム薬を含有するディスクと、 $\beta$ -ラクタム薬およびMBL阻害剤を含有するディスクとを被検菌を接種した寒天平板上に静置し、培養後の阻止円の直径の違いにより、MBL産生菌かどうか容易に判定することができる。

### 【0023】

【発明の効果】本発明は、チオール基を有していないキレート作用を有するジカルボン酸誘導体をMBL阻害剤

(1) CAZ	0.25-128 $\mu$ g/ml
(2) CAZ/MPA	0.25/200-128/200 $\mu$ g/ml
(3) CAZ/SMP	0.25/200-128/200 $\mu$ g/ml
(4) CAZ/SMA	0.25/25-128/25 $\mu$ g/ml
(5) CAZ/SMA	0.25/50-128/50 $\mu$ g/ml
(6) CAZ/SMA	0.25/100-128/100 $\mu$ g/ml
(7) CAZ/SMA	0.25/200-128/200 $\mu$ g/ml
(8) CAZ/SMA	0.25/400-128/400 $\mu$ g/ml
(9) CAZ/SMA	0.25/800-128/800 $\mu$ g/ml
(10) CAZ/SMA	0.25/1600-128/1600 $\mu$ g/ml
(11) CAZ/SMA	0.25/3200-128/3200 $\mu$ g/ml
(12) CAZ/DPA	0.25/25-128/25 $\mu$ g/ml
(13) CAZ/DPA	0.25/50-128/50 $\mu$ g/ml
(14) CAZ/DPA	0.25/100-128/100 $\mu$ g/ml
(15) CAZ/DPA	0.25/200-128/200 $\mu$ g/ml
(16) CAZ/DPA	0.25/400-128/400 $\mu$ g/ml

として用いているので、 $\beta$ -ラクタム薬系抗菌剤の保存安定性を向上させることができる。従って本発明によれば、 $\beta$ -ラクタム薬系抗菌剤の力価に影響を及ぼすことなく、一般検査室でのMBL産生菌のMIC測定が可能となると共に、一般病院や検査センターの細菌検査の自動化・システム化にも対応が可能である。

【0024】また、本発明は、 $\beta$ -ラクタム薬およびMBL阻害剤としてジカルボン酸を含有するディスクの製造および供給が可能となる。従って本発明によれば、 $\beta$ -ラクタム薬を含有するディスクと $\beta$ -ラクタム薬およびMBL阻害剤としてジカルボン酸を含有するディスクとの組合せを用いるMBL産生菌鑑別方法の開発が容易となる。

【0025】MBL産生菌は、ESBL産生菌よりも臨床上の薬剤耐性の問題は大きいが、未だ標準的な国際試験法が確立されていないのが現状である。本発明により、一般的な検査室で簡単にMBL産生菌の鑑別やMIC測定が可能となるので、このような国際標準法の作製が可能となる。

### 【0026】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づき更に詳細に説明するが、本発明はこれによって限定されるものではない。

【0027】実施例1 薬剤感受性試験用マイクロプレートの作成  
NCCLS標準法の微量液体希釈法に準じて $\beta$ -ラクタム薬としてCAZおよびIPMO.25-128 $\mu$ g/mlを含有するCAMHBの2倍希釈系列を作成し、96穴マイクロプレートに100 $\mu$ lずつ分注した。同様にその希釈系列にMBL阻害剤25-3200 $\mu$ g/mlを添加したCAMHB 2倍希釈系列を96穴マイクロプレートに100 $\mu$ lずつ分注した。

### 【0028】

(6) 003-135093 (P2003-135093A)

(17) CAZ/DPA	0.25/800-128/800 µg/ml
(18) CAZ/DPA	0.25/1600-128/1600 µg/ml
(19) CAZ/DPA	0.25/3200-128/3200 µg/ml
(20) IPM	0.25-128 µg/ml
(21) IPM/MPA	0.25/200-128/200 µg/ml
(22) IPM/SMP	0.25/200-128/200 µg/ml
(23) IPM/SMA	0.25/25-128/25 µg/ml
(24) IPM/SMA	0.25/50-128/50 µg/ml
(25) IPM/SMA	0.25/100-128/100 µg/ml
(26) IPM/SMA	0.25/200-128/200 µg/ml
(27) IPM/SMA	0.25/400-128/400 µg/ml
(28) IPM/SMA	0.25/800-128/800 µg/ml
(29) IPM/SMA	0.25/1600-128/1600 µg/ml
(30) IPM/SMA	0.25/3200-128/3200 µg/ml
(31) IPM/DPA	0.25/25-128/25 µg/ml
(32) IPM/DPA	0.25/50-128/50 µg/ml
(33) IPM/DPA	0.25/100-128/100 µg/ml
(34) IPM/DPA	0.25/200-128/200 µg/ml
(35) IPM/DPA	0.25/400-128/400 µg/ml
(36) IPM/DPA	0.25/800-128/800 µg/ml
(37) IPM/DPA	0.25/1600-128/1600 µg/ml
(38) IPM/DPA	0.25/3200-128/3200 µg/ml

【0029】上記(1)～(38)の希釈系列マイクロプレートにMBL産生菌 (*K. pneumoniae* 4134) および非産生菌 (*K. pneumoniae* 4153) それぞれ1株を接種し、35°Cで1晩培養したところ、遊離のMBL阻害剤としてMPAを含む(2), (21)は、強い悪臭がしたが、MBL産生菌と非産生菌とでは、MIC値の顕著な(3管=8倍以上)相違が認められた。同様に、MBL阻害剤100-1600 µg/mlを含むその他の系列ではMBL産生菌と非産生菌とで明らかな発育の違いが見られた。これに対し、MBL阻害剤25～50 µg/mlを含む(4), (5), (12), (13), (23), (24), (31), (32)ではMBL産生菌と非産生菌ともに発育し、阻害剤を含まない(1), (20)と同様であり、産生菌と非産生菌との区別がつかなかった。また、MBL阻害剤3200 µg/mlを含む(11), (19), (30), (38)ではMBL産生菌と非産生菌とも発育せず、それぞれの区別がつかなかった。なお、本プレートを-70°Cで凍結保存したが、6ヶ月後でも使用可能であった。

【0030】実施例2 微量液体希釈法(MIC法)によるMBL産生菌および非産生菌の確認  
PCR法によりMBL産生菌であることが確認されている *Klebsiella pneumoniae* 2株、*Pseudomonas aeruginosa* 13株、*Serratia marcescens* 34株、および同様にPCR法によりMBL非産生菌として確認されている *ESBL*産生 *Klebsiella pneumoniae* 2株、ペニシリナ

ーゼ(PCN)産生 *Klebsiella pneumoniae* 2株、セファロスボリナーゼ(CPN)産生 *Klebsiella pneumoniae* 2株を試験菌として用い、実施例1で作製したマイクロプレートのCAZ 0.25-128 µg/mlを含有するCAMHB液体培地(希釈系列)とCAZ/DPA 0.25/400-128/400 µg/mlを含有するCAMHB液体培地(希釈系列)との組合せ、及びIPMO. 25-128 µg/mlを含有するCAMHB液体培地(希釈系列)とIPM/DPA 0.25/400-128/400 µg/mlを含有するCAMHB液体培地(希釈系列)との組合せを用い、NCCLSガイドラインに従い、微量液体希釈法で試験菌を培養し、MICを測定した。純培養した試験菌の集落を釣菌し、トリプトソイブイヨンに懸濁させMcFarland濁度が0.5になるまで培養したものを希釈し、培地1 mlあたりの菌数が約10<sup>4</sup>個になるようにマイクロタイタープレートの各穴に接種し、35°Cで18時間好気培養したのち、それぞれの最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。 $\beta$ -ラクタム薬/MBL阻害剤合剤のMICが $\beta$ -ラクタム薬単独のMICより3管(8倍)以上離れているものをMBL産生菌と判定した。その結果を表1に示す。なお、本実施例の判定基準はNCCLSのESBL産生菌判定基準に準拠し、それと同一にした。

【0031】

【表1】

菌名	type	薬剤名
----	------	-----

(7) 003-135093 (P2003-135093A)

CAZ IPM

Klebsiella pneumoniae 4137	MBL	MBL
Klebsiella pneumoniae 4635	MBL	MBL
Klebsiella pneumoniae 4153	PCN	
Klebsiella pneumoniae 4154	PCN	
 Klebsiella pneumoniae 4144	CPN	
Klebsiella pneumoniae 4145	CPN	
Klebsiella pneumoniae 4120	ESBL	
Klebsiella pneumoniae 4124	ESBL	
Pseudomonas aeruginosa 5103	MBL	MBL
Pseudomonas aeruginosa 5106	MBL	MBL
Pseudomonas aeruginosa 5109	MBL	MBL
Pseudomonas aeruginosa 5110	MBL	MBL
Pseudomonas aeruginosa 5112	MBL	MBL
Pseudomonas aeruginosa 5101	MBL	MBL
Pseudomonas aeruginosa 5100	MBL	MBL
Pseudomonas aeruginosa 5107	MBL	MBL
Pseudomonas aeruginosa 5108	MBL	MBL
Pseudomonas aeruginosa 5111	MBL	MBL
Pseudomonas aeruginosa 5104	MBL	MBL
 Pseudomonas aeruginosa 5105	MBL	MBL
Pseudomonas aeruginosa 5102	MBL	MBL
Serratia marcescens 5118	MBL	MBL
Serratia marcescens 5147	MBL	MBL
Serratia marcescens 5113	MBL	MBL
Serratia marcescens 5135	MBL	MBL
Serratia marcescens 5131	MBL	MBL
Serratia marcescens 5142	MBL	MBL
Serratia marcescens 5146	MBL	MBL
Serratia marcescens 5123	MBL	MBL
Serratia marcescens 5143	MBL	MBL
Serratia marcescens 5130	MBL	MBL
Serratia marcescens 5141	MBL	MBL
Serratia marcescens 5114	MBL	MBL
 Serratia marcescens 5116	MBL	MBL
Serratia marcescens 5158	MBL	MBL
Serratia marcescens 5134	MBL	MBL
Serratia marcescens 5144	MBL	MBL
Serratia marcescens 5145	MBL	MBL
Serratia marcescens 5150	MBL	MBL
Serratia marcescens 5138	MBL	MBL
Serratia marcescens 5154	MBL	MBL
Serratia marcescens 5161	MBL	MBL
Serratia marcescens 5115	MBL	MBL
Serratia marcescens 5125	MBL	MBL

(8) 003-135093 (P2003-135093A)

Serratia marcescens	5119	MBL	MBL	MBL
Serratia marcescens	5140	MBL	MBL	MBL
Serratia marcescens	5139	MBL	MBL	MBL
Serratia marcescens	5132	MBL		MBL

Serratia marcescens	5159	MBL	MBL	MBL
Serratia marcescens	5162	MBL	MBL	MBL
Serratia marcescens	5133	MBL		MBL
Serratia marcescens	5122	MBL	MBL	MBL
Serratia marcescens	5151	MBL	MBL	MBL
Serratia marcescens	5149	MBL	MBL	MBL
Serratia marcescens	5152	MBL	MBL	MBL

感度	96%	96%
----	-----	-----

特異性	100%	100%
-----	------	------

一致率	96%	96%
-----	-----	-----

【0032】上記表1において、感度とは（MBL産生菌と正しく判定された菌数）／（全MBL産生菌数）を表し、特異性とは（非MBL産生菌と正しく判定された菌数）／（全非MBL産生菌数）を表し、一致率とは（MBL・非MBL産生菌と正しく判定された菌数）／（全検体数）を表している。言い換えれば、感度はMBL産生菌がMBL産生菌として正しく判定される確率をいい、特異性はMBL産生菌でないものがMBL産生菌でないと判定される確率をいい、一致率はそれぞれが正しく判定される確率を表す。つまりCAZで言えば、感度は $47/49 = 96\%$ となり、特異性は $6/6 = 100\%$ となり、一致率は $53/55 = 96\%$ となる。

【0033】表1の結果より、CAZでMBL産生菌と判定された菌数は47株であるので、その感度は $47/49 = 96\%$ であり、また特異性は100%であった。MBLの一致率は96%と高く、本発明は一般的の微生物

(1) CAZ 0.25-128 µg/ml

(2) CAZ/DPA 0.25/400-128/400 µg/ml

薬剤を固定化乾燥したプレートの各穴にCAMHB10 $0\mu\text{l}$ を分注し薬剤を溶解し、実施例2で使用したMBL産生菌49株、MBL非産生菌6株を接種し、実施例2と同様に操作し、MICを測定した。その結果、本薬剤を固定化乾燥したプレートも、実施例2と同様の菌の発育を示し、感度・特異性・一致率も同一成績であった。MBL阻害剤は不揮発性の有機酸であるので、乾燥プレートとして作製・保存してもそのMBL阻害作用は保持されていた。

検査室でのMBL産生菌の簡易スクリーニング法として有用性が高いと考えられる。さらにIPMと組み合わせれば、MBL産生菌は2株増えて49株と判定される。つまり感度は $49/49 = 100\%$ 、特異性は $6/6 = 100\%$ 、一致率は $55/55 = 100\%$ とさらに高率となる。被検菌数をさらに増やして確認すれば、本方法はMBL産生菌の確認試験として使用できる可能性がある。

【0034】実施例3 薬剤を固定化乾燥したプレートの作成及びMICの測定

液体培地 $100\mu\text{l}$ を加えて溶解した時に下記の濃度となるようにCAZ及びCAZ/DPAの薬剤2倍希釈系列溶液を調製し、96穴マイクロプレートに適量分注し、45°Cで60分間送風乾燥し、薬剤を固定化乾燥したプレートを作成した。

【0035】実施例4 MBL阻害剤を含有した乾燥ディスクの作製及び保存安定性

遊離のチオール化有機酸、及びチオール化有機酸の塩を含む乾燥ディスクと、チオール基を有していない有機酸を含む乾燥ディスクとを作製し、ディスク拡散法を行い阻止円直径を測定した。

(1) SMA (2.9mg/ディスク含有)

(2) MPA (2.7mg/ディスク含有)

(3) DPA (0.5mg/ディスク含有)

(9) 003-135093 (P2003-135093A)

市販のSMA、MPAを精製水に溶解し、1.0モルの水溶液を作製した。DPAは、0.05モルのEHEPE緩衝液pH7.0に溶解し、最終濃度0.12モルのDPA水溶液を作製した。KBディスク用の直径6.35mmの沪紙ディスクに上記の各調製溶液25μlを滴下し、50℃で60分間乾燥し、SMAディスク、MPAディスク、DPAディスクを作製した。PCR法であらかじめMBL産生菌であることが確認されている肺炎桿菌(*K. pneumoniae*)1株、および黴菌(*S. marcescens*)1株、綠膿菌(*P. aeruginosa*)2株を用いて、J.Clin.Microbiol., 38(1), 40, 2000に従った方法で操作し、その阻止円の直径を測定した。NCCLSのディスク法(標準法)に準じて、純培養した試験菌の集落を釣菌し、トリプトソイブイヨンに懸濁させ、McFarland濁

度が0.5になるまで培養したものを綿棒を用いてミユーラーヒントン寒天培地(MHA)表面に均一に接種した。菌を接種した寒天平板培地表面上に2枚のKBディスクCAZ(栄研化学製)を3~5cm離して接置し、どちらか片方のKBディスクCAZからさらに1.5~2cm離してMBL阻害剤ディスク(SMAディスク、MPAディスク、もしくはDPAディスク)を載せ、35℃で18時間好気培養し、各CAZディスクの周囲に形成された阻止円直径をシャーレの裏からmm単位で正確に測定した。また上記作製の各MBL阻害剤を含有したディスクを37℃に保存して1週間毎に試験を行い、4週目まで測定を行った。その結果を表2~表6に示す。

## 【0036】

【表2】

MBL産生菌 ディスク作製当日測定成績

菌名	薬剤名 (阻止円直径 mm)			
	CAZ	CAZ/SMA	CAZ/MPA	CAZ/DPA
<i>K. pneumoniae</i> 4635	7	24	11	13
<i>S. marcescens</i> 4636	7	24	11	13
<i>P. aeruginosa</i> 4637	7	23	10	12
<i>P. aeruginosa</i> 4638	7	23	10	12

## 【0037】

【表3】

MBL産生菌 ディスク作製後37℃1週間保存の測定成績

菌名	薬剤名 (阻止円直径 mm)			
	CAZ	CAZ/SMA	CAZ/MPA	CAZ/DPA
<i>K. pneumoniae</i> 4635	7	24	0	13
<i>S. marcescens</i> 4636	7	24	0	13
<i>P. aeruginosa</i> 4637	7	23	0	12
<i>P. aeruginosa</i> 4638	7	23	0	12

## 【0038】

【表4】

MBL産生菌 ディスク作製後37℃2週間保存の測定成績

菌名	薬剤名 (阻止円直径 mm)			
	CAZ	CAZ/SMA	CAZ/MPA	CAZ/DPA
<i>K. pneumoniae</i> 4635	7	24	0	13

(20) 03-135093 (P2003-135093A)

<i>S. marcescens</i>	4636	7	24	0	13
<i>P. aeruginosa</i>	4637	7	23	0	12
<i>P. aeruginosa</i>	4638	7	23	0	12

【0039】

【表5】  
MBL産生菌 ディスク作製後37℃3週間保存の測定成績

菌名	薬剤名 (阻止円直径 mm)				
	CAZ	CAZ/SMA	CAZ/MPA	CAZ/DPA	
<i>K. pneumoniae</i>	4635	7	24	0	13
<i>S. marcescens</i>	4636	7	24	0	13
<i>P. aeruginosa</i>	4637	7	23	0	12
<i>P. aeruginosa</i>	4638	7	23	0	12

【0040】

【表6】  
MBL産生菌 ディスク作製後37℃4週間保存の測定成績

菌名	薬剤名 (阻止円直径 mm)				
	CAZ	CAZ/SMA	CAZ/MPA	CAZ/DPA	
<i>K. pneumoniae</i>	4635	7	24	7	13
<i>S. marcescens</i>	4636	7	24	7	13
<i>P. aeruginosa</i>	4637	7	23	7	12
<i>P. aeruginosa</i>	4638	7	23	7	12

【0041】各菌の阻止円直径は表2-表6に示すとおりであった。本実施例の判定基準はNCCLS法のESBL産生菌確認試験と同様に、本発明におけるCAZディスクとCAZ/SMA(DPA)ディスクの阻止円直径の差が5mm以上の時、試験菌をMBL産生菌と判定することにした。表2において、各菌(MBL産生菌)はCAZディスクとCAZ/SMAディスクの組合せで阻止円径の差が5mm以上であるので、MBLと判定された。またCAZディスクとCAZ/DPAディスクに関しても同様に全ての菌においてその阻止円径の差が5mm以上であるので、MBLと判定された。しかし、CAZディスクとCAZ/MPAディスクに関しては全ての菌の阻止円径の差が5mm未満であるのでMBLとは判定されなかった。これは、MPAディスク作製の乾燥時にMPAが揮発し、ディスク中のMPA含有量が減少した影響と考えられる。表3-表6においても同様な結果であ

り、CAZ/SMAディスクとCAZ/DPAのディスクは37℃保存で少なくとも4週間安定してMBLを判定することが可能であった。これは冷所保存であれば1年間以上の保存安定性に相当する。

【0042】実施例5 同一ディスクにCAZ/DPAを含有する乾燥ディスクの作成及び使用  
栄研化学(株)製の直径6.35mmのKBディスクCAZ(30μg含有)に0.12モルのDPA溶液25μlを滴下し、50℃で60分間乾燥し、CAZ/DPAディスクを作製した。また、同様にKBディスク用の直径6.35mmの汎紙ディスクにDPA溶液25μlを滴下し、50℃で60分間乾燥し、DPAディスクを作製した。PCR法であらかじめMBL産生菌であることが確認されている肺炎桿菌1株、靈菌1株、および緑膿菌2株を用いて、NCCLSのディスク法に準じて純培養した試験菌の集落を釣菌し、トリプトソイブイヨンに懸濁

(1) 03-135093 (P2003-135093A)

させ McFarland 濁度が 0.5 になるまで培養したものを綿棒を用いて MHA 表面に均一に接種した。その上に KB ディスク CAZ を置き、それより 3cm 以上離して CAZ/DPA ディスクを置き、さらに 3cm 以上離して DPA ディスクを置き、35°C で 18 時間好気培養

## MBL 产生菌の測定結果

し、CAZ ディスク、CAZ/DPA ディスク、および DPA ディスクの阻止円直径を測定した。

【0043】

【表7】

菌名	薬剤名 (阻止円直径 mm)		
	CAZ	CAZ/DPA	DPA
K.pneumoniae 4635	7	13	0
S.marcescens 4636	7	13	0
P.aeruginosa 4637	7	12	0
P.aeruginosa 4638	7	12	0

【0044】各菌の阻止円直径は表7に示すとおりであった。表7に示すように、各菌 (MBL 产生菌) は CAZ ディスクと CAZ/DPA ディスクとの組合せにおいて、全ての菌の阻止円直径の差が 5mm 以上であるので、MBL と判定された。また、DPA ディスク単独での発育阻止は CAZ/DPA ディスクの発育阻止に比べて顕著に小さく、故に DPA 自身の抗菌力は、ほとんど無視できると考えられ、CAZ ディスクと CAZ/DPA ディスクとの組み合わせで MBL の判定が可能であった。

【0045】実施例6 MBL 阻害剤を含有した寒天培地平板の作製とその使用

DPA を含有する CAMHA と DPA を含有しない CAMHA とを 2 分画シャーレに分注し、寒天平板を作成した。KB ディスク CAZ を静置し、その阻止円の形成を観た。市販の DPA を 0.05 モルの EHEPE 緩衝液 pH 7.0 に溶解し、8000 μg/ml の DPA 溶液を作製した。あらかじめ 121°C で 15 分間の高压滅菌した

## MBL 产生菌の測定結果

CAMHA 培地を 50°C に冷却し、CAMHA 1.9ml に対して DPA 溶液 1ml を加えて攪拌し均一な寒天培地溶液にした。分画シャーレの一画に CAMHA 1.0ml を分注し、もう一画に DPA を含有した CAMHA 1.0ml を分注した。寒天培地が固化後、シャーレの蓋をずらして寒天表面の凝水を乾燥させ、CAMHA 平板を作製した。PCR 法であらかじめ MBL 产生菌であることが確認されている肺炎桿菌 1 株、靈菌 1 株、および綠膿菌 2 株を用いて、NCL S のディスク法に準じて純培養した試験菌の集落を釣り、トリプトソイブイヨンに懸濁させて McFarland 濁度が 0.5 になるまで培養したものを綿棒を用いて CAMHA 表面と DPA を含有した CAMHA 表面とに均一に接種した。2 分画シャーレの各培地上に KB ディスク CAZ を 1 枚ずつおき、培養後各 CAZ ディスクの阻止円直径を測定した。

【0046】

【表8】

菌名	培地 (CAZ ディスクの阻止円直径 mm)	
	CAMHA	DPA 含有 CAMHA
K.pneumoniae 4635	7	24
S.marcescens 4636	7	24
P.aeruginosa 4637	7	23
P.aeruginosa 4638	7	23

【0047】各菌の阻止円直径は表8に示すとおりであ

った。表8に示すように、各菌 (MBL 产生菌) は CA

(2) 103-135093 (P 2003-135093A)

MHA上のCAZディスクとSMADPAを含有したC  
AMHA上のCAZディスクとの組合せにおいて、全て  
の菌の阻止円直径の差が5mm以上であるので、MBLと  
判定された。  
【0048】

---

フロントページの続き

(72)発明者 池戸 正成  
栃木県下都賀郡野木町野木143 栄研化学  
株式会社生物化学研究所  
F ターム(参考) 4B029 AA08 GA03 GB05  
4B063 QA06 QQ05 QQ61 QQ98 QR41  
QR68 QR74 QS39 QX01